UNIVERSITE DE PARIS V
FACULTE DE MEDECINE NECKER-ENFANTS MALADES

THESE

pour le

80

DOCTORAT en MEDECINE

Diplôme d'Etat

par

Pierre GALANAUD
né le 5 Février 1944 à Alger - ALGERIE
Interne des Hôpitaux de Paris

Présentée publiquement et soutenue le 1971

Etudes immunologiques dans un cas de néphropathie glomérulaire associée à une anémie hémolytique auto-immune. Recherche d'une sensibilisation contre l'acide désoxyribonucléique au niveau cellulaire.

Président M. Jean HAMBURGER, Professeur

UNIVERSITE PARIS V

FACULTE DE MEDECINE NECKER - ENFANTS MALADES

Année 1971 N°

THESE

pour
le

DOCTORAT en MEDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Pierre G A L A N A U D
né le 5 Février 1944 à Alger - ALGERIE

Présentée et soutenue publiquement le 19

Etudes Immunologiques dans un cas de néphropathie glomérulaire associée à une anémie hémolytique auto-immune. Recherche d'une sensibilisation contre l'acide désoxyribonucléique au niveau cellulaire.

Président : M. Jean HAMBURGER, Professeur

VU
et PERMIS D'IMPRIMER
LE RECTEUR
DE L'ACADEMIE DE PARIS

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mes Parents

A ma Femme

A Monsieur le Professeur Jean HAMBURGER

qui a très largement contribué à l'orientation et à la mise en oeuvre de ce travail.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude et de ma respectueuse admiration.

A Monsieur le Professeur Agrégé Jean DORMONT

qui a guidé mes premiers pas en Immunologie, et continue à m'apporter son aide précieuse en même temps que son amitié.

Qu'il trouve ici la marque de ma fidèle affection.

A Monsieur le Professeur Jean CROSNIER

qui m'a fait profiter, dans l'étude
de ce cas, comme en bien d'autres
occasions, de sa riche expérience.

Au Docteur Jean-François BACH

dont l'exemple et l'amitié ont
largement contribué à mon orientation.

A tous les autres membres de la Clinique Néphrologique qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail :

- Le Professeur agrégé J. BERGER
- Mademoiselle M.C. BREVON
- Madame le Docteur M. DARDENNE
- Madame le Docteur N. HINGLAIS
- Monsieur le Docteur J.Ph. MAHIEU

A Monsieur le Professeur Agrégé C. ALBAHARY

qui a bien voulu nous confier
cette malade.

A Monsieur le Professeur Gabriel RICHET

auprès duquel j'ai passé
un temps si riche d'enseignements.

A mes Maîtres d'Externat

- Le Doyen CORDIER
- Monsieur le Professeur ETIENNE-BERNARD
- Monsieur le Professeur GILBERT-DREYFUS
- Monsieur le Professeur M. LAMOTTE

A mes Maîtres d'Internat,

Messieurs les Professeurs

- J. CATINAT
- J. CROSNIER
- M. DEROT
- A. DOMART
- J. HAMBURGER
- M. PEQUIGNOT
- G. RICHET

Les tests immunologiques permettant de rechercher in vitro une sensibilisation cellulaire sont d'utilisation beaucoup moins courante que ceux qui permettent l'étude de l'immunité humorale, au cours des affections où une pathogénie auto-immune est possible.

Trois types de tests ont été essentiellement développés :

- L'étude de la stimulation d'une culture de lymphocytes par un antigène supposé responsable en particulier au cours de la sclérose en plaques (6, 10), des thyroïdites auto-immunes.

- L'étude de l'inhibition de la migration des leucocytes du sang périphérique en présence d'antigènes, au cours de nombreuses affections : thyroïdites auto-immunes, insuffisances cortico-surrénales primitives, anémie de Biermer, sclérose en plaques, syndrome de Sjögren, néphropathies glomérulaires, lupus érythémateux disséminé (citées dans 34).

- L'étude des cellules formant les rosettes avec des hématies recouvertes de l'antigène correspondant, d'une part dans les thyroïdites auto-immunes (16), d'autre part dans la polyarthrite rhumatoïde (4).

De telles études ont rarement été réalisées avec de l'acide désoxyribonucléique au cours des maladies dites du collagène. Nous avons été amenés à utiliser deux de ces tests chez une patiente qui présentait des manifestations cliniques évocatrices de lupus érythémateux aigu disséminé, et chez qui la recherche d'anticorps circulants de la série lupique n'a pas permis d'affirmer ce diagnostic.

I - OBSERVATION CLINIQUE

Mme DER. est une jeune femme de 31 ans, sans profession. Elle consulte pour la première fois dans le Service du Professeur Hamburger, pour un syndrome néphrotique, en octobre 1970.

L'étude de ses antécédents :

- ne permet de retrouver aucune affection particulière parmi les membres de sa famille : aucune affection à transmission génétique, pas d'affection rhumatologique inflammatoire, rien n'évoquant une déficience immunitaire.

- Mme Der. a eu une grossesse en 1961 : celle-ci s'est déroulée normalement, l'absence de protéinurie et d'hypertension artérielle a été vérifiée, et s'est terminée par la naissance d'une fille de poids normal, qui est bien portante.

- un seul antécédent pathologique est retrouvé, c'est un

Purpura Thrombopénique :

Le purpura a été découvert en juin 1959, alors que Mme Der. avait 20 ans, à l'occasion de troubles hémorragiques : gingivorragies, épistaxis, ménorragies. On découvre alors une thrombopénie à 10 000 éléments/mm3 ; la moelle sternale est riche en mégacaryocytes. La vitesse de sédimentation érythrocytaire est accélérée. Aucune autre anomalie hématologique n'est retrouvée : les leucocytes sont normaux en nombre et en répartition ; il n'y a pas d'anémie ; le test de Coombs est négatif. L'examen clinique et les autres examens complémentaires ne permettent de déceler aucune autre atteinte systémique.

La malade reçoit dans les premiers jours de son hospitalisation deux transfusions de sang enrichi en plaquettes, sans effet sur les troubles cliniques. Un traitement corticoïde est entrepris, à une posologie qui n'a pu être précisée rétrospectivement. Il n'a aucun effet sur la thrombopénie, et il est abandonné par la malade au bout de quelques mois.

En 1960, une splénectomie est pratiquée. Nous n'avons pas pu retrouver d'examen anatomo-pathologique de la pièce d'exérèse. Dans les suites de cette intervention, on assiste à une normalisation transitoire du taux de plaquettes (250 000/mm3). Mais, après quelques semaines, la thrombopénie réapparaît.

En 1961, Mme Der. est enceinte. Cette grossesse s'est déroulée normalement, nous l'avons vu. La grossesse et les suites de couches ne sont l'occasion d'aucune accentuation ni d'aucun enrichissement de la symptomatologie ; le taux de plaquettes, habituellement aux alentours de 50 000/mm3, était de 10 000/mm3 peu après l'accouchement. Il n'y a eu, lors de l'accouchement, aucune tendance hémorragique inquiétante.

Entre 1961 et 1967, Mme Der. ne se soumet à aucune surveillance médicale. Elle ne se plaint d'aucun trouble, en dehors de ménorragies et d'ecchymoses apparamment spontanées assez fréquentes.

En 1967, elle consulte à nouveau un médecin, et une série d'examens sont pratiqués à cette occasion. Ils permettent de constater, d'une part la persistance de la thrombopénie, d'autre part le caractère strictement isolé de celle-ci : elle ne s'accompagne d'aucune autre manifestation hématologique ou systémique. Des examens à la recherche d'une étiologie lupique sont effectués : il n'y a pas de cellules L.E. ; la recherche d'anticorps anti-nucléaires est négative. Un traitement corticoïde est conseillé ; il est refusé. Mme Der. accepte néanmoins de se soumettre à une surveillance régulière, qui confirme l'impression de stabilité évolutive.

En Février 1970, un volumineux abcès péri-trochantérien se développe à partir d'un hématome infecté et nécessite un drainage chirurgical.

On constate à partir de cette époque un certain degré de réparation de la thrombopénie, puisque les taux de plaquettes vont se maintenir aux alentours de 100 000/mm3. En mars 1970, un nouvel épisode infectieux survient : c'est une otite suppurée qui conduit à une paracentèse. Dans les suites de cette intervention, Mme Der. se plaint de quelques arthralgies, qui ont duré 24 heures, et elle présente une éruption érythémateuse, sur la face et les membres supérieurs, également transitoire. Il a été impossible

de faire préciser les médicaments reçus durant cette période, et un éventuel rapport chronologique entre leur administration et la survenue de ces phénomènes. Dans un contexte aussi imprécis, et en l'absence de toute description précise des phénomènes relatés, il est impossible d'en tenter une quelconque interprétation.

La première traduction de la néphropathie se manifeste au cours de l'été 1970 : Mme Der. présente des oedèmes des membres inférieurs, ce qui conduit à la découverte d'une protéinurie et d'un syndrome néphrotique. Jusqu'à cette date, toutes les recherches de protéinurie pratiquées avaient été négatives, la dernière remontant à mars 1970. La malade est alors adressée en consultation dans le Service du Professeur Hamburger, et hospitalisée en novembre 1970.

A cette date, la situation peut être analysée comme suit :

. La patiente est en bon état général et ne se plaint d'aucun trouble subjectif. La courbe thermique est normale.

. Les oedèmes des membres inférieurs ont disparu, sous l'influence d'un traitement diurétique. L'examen clinique est normal, en dehors d'une hépatomégalie modérée, ferme, indolore.

Le tableau néphrologique suivant est réalisé :

. une protéinurie abondante, comprise entre 2 et 5 mg/mn ; l'électrophorèse et l'immuno-électrophorèse des protéines urinaires permettent de constater qu'elle est constituée presque uniquement d'albumine.

. dans le sang, on retrouve les éléments d'un syndrome néphrotique :

protides totaux	: 47 g/l
albumine	: 17,2 g/l
α_1 globulines	: 2,1 g/l
α_2 globulines	: 7,2 g/l
β globulines	: 7,2 g/l
γ globulines	: 13,2 g/l

les lipides totaux et le cholestérol total sont élevés.

Ainsi, ce syndrome néphrotique a la particularité de ne pas comporter de diminution des γ-globulines. L'immuno-électrophorèse confirme ces données, et permet de préciser qu'il existe une augmentation diffuse desIgG et des IgM.

. le débit-minute des éléments figurés urinaires se caractérise par une hématurie microscopique (100 000 hématies/mn, avec 25 000 leucocytes/mn). La culture des urines est stérile.

. la pression artérielle est normale. L'examen des fonds d'yeux ne permet de constater aucune anomalie.

. l'urographie intraveineuse est normale, dans sa cinétique et sa morphologie.

. il n'existe pas d'insuffisance rénale :
  - la clearance de l'urée est de 62 ml/mn
  - la clearance de la créatinine est de 112 ml/mn.

Il s'agit donc d'un syndrome néphrotique associé à une hématurie microscopique ; cette néphropathie ne s'accompagne d'aucun symptôme vasculaire, d'aucune détérioration fonctionnelle rénale.

La situation hématologique de Mme Der. s'est quelque peu modifiée depuis les précédents examens, remontant à quelques mois :

. la tendance à la correction de la thrombopénie se confirme :

le taux des plaquettes sanguines est de 160 000/mm3 ; la richesse de la moelle en mégacaryocytes est normale ; mais les fonctions plaquettaires sont modérément altérées ; l'étude de l'hémostase montre :

. une diminution de l'activité plaquettaire, alors que :
. la consommation de prothrombine est normale
. la rétraction du caillot est normale, avec une anémie modérée.

les autres facteurs de l'hémostase sont normaux ; la coagulabilité globale est diminuée modérément, dans des limites qui ne contre-indiquent pas une biopsie rénale.

. un syndrome hémolytique est apparu :

anémie modérée (hématocrite 37 %) normochrome (hémoglobine 12,7 g% ml). Le myélogramme montre une érythroblastone (44 %). Le test de Coombs direct est positif.

. la numération des globules blancs montre 13 400 éléments/mm3, avec une formule équilibrée.

. les autres examens complémentaires ne permettent pas d'affirmer l'existence d'autres atteintes systémiques.

. l'état de la crase sanguine étant relativement satisfaisant, une biopsie rénale chirurgicale est pratiquée (le 30 novembre 1970).

L'étude en microscopie optique du fragment montre (Dr Hinglais) :

Une cinquantaine de glomérules, pas de pain à cacheter.

Glomérules :

Premièrement, ils sont tous le siège d'une prolifération modérée des cellules intercapillaires ; cette prolifération est irrégulière, plus marquée sur certains lobules que sur d'autres, elle s'accompagne de quelques polynucléaires. Il y a peu de dépôts membranoïdes.
Deuxièmement, il existe fréquemment dans les lumières capillaires de petits thrombus de substance très acidophile évoquant la fibrine.
Troisièmement, les parois capillaires sont épaissies de façon segmentaire par des dépôts extra-membraneux dont certains plus volumineux et acidophiles que les autres évoquent l'aspect de "Hump". Sur les imprégnations argentiques de coupes fines de microscopie électronique, on constate en outre la présence de petits dépôts fibrinoïdes sous-endothéliaux et intercapillaires.

Tubes :

Ils sont normaux. Quelques gouttelettes acidophiles de type "mégamitochondries."

Interstitium :

Il est sensiblement normal.

Vaisseaux :

Quelques lésions discrètes d'endarthérite fibreuse.

CONCLUSION :

Glomérulonéphrite proliférative endocapillaire avec des thromboses intracapillaires et des dépôts extra-membraneux segmentaires.
Reste du parenchyme normal.

L'examen en immunofluorescence montre (Dr Berger) :

des dépôts, correspondant aux dépôts extra-membraneux, révélés par les antisérums suivants :

- . sérum anti IgG (fixation nette)
- . sérum anti IgA (fixation très faible)
- . sérum anti C_4 (fixation nette)
- . il n'y a pas de fixation sur ces dépôts de sérum anti IgM, C_3, fibrinogène et albumine.
- . l'utilisation d'antisérums spécifiques de classe de chaîne légère révèle seulement la présence de déterminants kappa dans ces dépôts, et ne met pas en évidence de déterminants lambda .

on observe, une fixation nette du sérum anti C_3 sur le mésanguin.

le taux du B_{1A}-B_{1C} sérique évalué par immunodiffusion n'est pas abaissé : 140 unités. Il n'a été fait à cette date ni titrage de l'activité hémolytique du sérum, ni évaluation de C_4.

Les examens complémentaires visant à préciser la nature d'une éventuelle maladie générale n'apportent aucun élément positif :

- . 3 recherches de cellules L.E. sont négatives.
- . la recherche d'anticorps anti-nucléaires, par fixation sur coupes de foie de rat, est positive au 1/10.
- . la recherche d'anticorps anti-ADN (immunofluorescence sur fibres d'acide désoxyribonucléique synthétique) est négative.
- . la recherche de facteur rhumatoïde est négative.
- . la recherche de cryoglobuline est négative.
- . la sérologie de la syphilis est négative.

Ainsi, aucune certitude ne peut être acquise sur la nature primitive ou non de cette néphropathie très particulière. Devant cette incertitude, devant le caractère apparamment peu évolutif des anomalies hématologiques, et en raison du refus de Mme Der. de toute corticothérapie, et de son indocilité à se soumettre à la surveillance stricte que nécessiterait

un traitement immunosuppresseur, aucune thérapeutique autre que symptomatique n'est proposée.

Mme Der. revient dans le Service en février 1971. Elle se plaint depuis environ une semaine d'une douleur thoracique et de fièvre.

On est d'emblée frappé par la pâleur extrême de la malade. La suspicion de poussée hémolytique est renforcée par la coloration des urines ; l'interrogatoire révèle que cette coloration, bien que moins intense, est apparue environ trois semaines auparavant. Cette apparition est antérieure aux signes fonctionnels pulmonaires, et n'a coïncidé avec la prise d'aucun médicament.

L'examen clinique révèle l'existence d'un foyer parenchymateux de la base droite ; ce que confirme la radio en montrant une opacité non systématisée, assez mal limitée. Deux ponctions pleurales restent blanches.

Le reste de l'examen ne révèle que des oedèmes modérés des membres inférieurs, et une hépatomégalie.

Par contre, en coïncidence avec cette crise hémolytique, deux éléments nouveaux sont apparus :

- une aménorrhée, qui remonte à deux cycles.
- de très nombreux exsudats de type dysorique à l'examen des fonds d'yeux ; la tension artérielle est toujours strictement normale (maxima entre 90 et 110 mm de mercure) et le restera.

Les premiers examens complémentaires confirment l'existence d'une anémie hémolytique patente : hématocrite 21 % ; taux de réticulocytes à 600 000/mm3 ; anisocytose ; présence d'hématies nucléées. Il existe une hyperleucocytose à 50 000/mm3 avec présence de métamyélocytes et de myélocytes dans le sang. Les plaquettes sont normales, autour de 500 000/mm3. L'uricémie est élevée à 115 mg/l.

Le tableau néphrologique demeure inchangé : protéinurie massive (3-5 mg/mn) avec syndrome néphrotique franc ; fonction rénale normale.

Dans les premiers jours de l'hospitalisation, une hémolyse intense persiste, puisque l'hématocrite va s'abaisser jusqu'à 12 % avec un taux

d'hémoglobine de 3g pour 100 ml. Cette hémolyse intra-vasculaire va s'accompagner d'une insuffisance rénale modérée et transitoire, comme en témoigne une oligurie de 24 heures, à l'acmé de l'hémoglobinurie et une légère élévation de la créatininémie (16 mg/l). Les examens pratiqués avant transfusion confirment la positivité du test de Coombs direct, jusqu'à des dilutions considérées comme importantes par le laboratoire ; le test de Coombs indirect est faiblement positif, au 1/2. La spécificité des anticorps fixés sur les globules rouges, étudiée après élution, est très large, à la fois anti D et anti I ; aussi n'est-il pas possible de sélectionner pour les transfusions des sangs dont les hématies ne comportent pas les antigènes en cause : toutes les transfusions nécessaires sont faites avec du sang isogroupe ABO, iso Rh. Un tel syndrome hémolytique, non compensable par la réaction médullaire, persiste pendant environ deux semaines, nécessitant de nombreuses transfusions. Puis l'hématocrite se stabilise spontanément aux alentours de 20 %.

L'évolution du foyer pulmonaire est tenace, incitant à temporiser dans la mise en oeuvre d'un traitement corticoïde et immunosuppresseur à doses suffisantes. Les signes cliniques et radiologiques disparaissent dans un délai de trois semaines. Un traitement antibiotique comportant de la Céphaloridine et de la Gentamycine, reçu pendant les deux premières semaines, n'a aucun effet apparent sur cette évolution. Les recherches de germes banals dans l'expectoration ne montrent pas de germe dominant ; celles de bacille de Koch et de levures sont négatives. La recherche d'agglutinines froides est négative.

La fièvre reste notablement élevée, aux alentours de 39°, pendant une semaine ; puis une fébricule persiste, qui ne disparaîtra qu'à la mise en oeuvre du traitement corticoïde et immunosuppresseur.

Les examens complémentaires pratiqués à ce moment, avant toute transfusion, et avant tout traitement immunosuppresseur ont pour objet, d'une part de préciser le profil immuno-hématologique, d'autre part de rechercher une nouvelle fois si une maladie générale pouvait sous tendre l'ensemble des anomalies présentées par cette patiente.

. L'étude des anticorps fixés sur les hématies*, au moyen d'antisérums

---

* Dr. Hombert, Hôpital St. Antoine.

monospécifiques montre que la positivité du test de Coombs direct est due à des anticorps anti-érythrocytaires de deux classes distinctes :

- les uns de classe IgG
- les autres de classe IgM
- en outre, l'utilisation de sérums anticomplément montre la présence de complément fixé in vivo par les complexes antigène-anticorps formés ; l'anticorps responsable de cette fixation est de type IgM (18).

  L'élution de ces anticorps des hématies permet de préciser leur spécificité :

  anti Rh pour les IgG
  anti I pour les IgM fixant le complément

. La recherche d'anticorps anti-plaquettes par étude de la fixation du complément en présence de plaquettes allogéniques est positive.* Cependant cette positivité, bien que très probable en raison de l'intensité de la réaction, ne peut être affirmée de façon formelle : le sérum de Mme Der. possède en effet un léger pouvoir anti-complémentaire. La signification de cette iso-immunisation est à discuter en sachant que la malade a reçu trois transfusions de sang enrichi en plaquettes en 1959, et qu'elle a eu une grossesse depuis.

. la recherche d'anticorps anti-leucocytes par cytotoxicité est négative.*

Les explorations à visée étiologique pratiquées au cours de cette hospitalisation n'apportent pas davantage d'éléments de certitude : avant tout traitement, et lors d'une période "d'activité" indiscutable de la maladie, cinq recherches de cellules L.E. ont été négatives ; la recherche d'anticorps anti-nucléaires reste négative aux dilutions supérieures au 1/10 ; il n'a pas été fait de nouvelle recherche d'anticorps anti-ADN.

La recherche d'anticorps dirigés contre les microsomes, et contre divers tissus a également été pratiquée (Dr Homberg). Elle ne permet de mettre en évidence que des anticorps anti-estomac à un titre très faible, ce qui est dépourvu de signification précise.

Le taux du complément, mesuré par l'activité hémolytique totale du sérum est abaissé, mais modérément : 318 unités (normale 514 $\pm$ 70 unités).

---

* Mme Prou, Laboratoire du Pr J.P. Soulier, C.N.T.S.

Ce résultat doit être interprété en tenant compte du fait que l'anticorps responsable de l'anémie hémolytique fixe le complément in vivo.

C'est lors de cette deuxième hospitalisation, au cours de cette poussée de la maladie, que les études d'immunologie cellulaire ont été effectuées.

Le traitement institué comporte :

des corticoïdes : Betamethasone à la dose de 0,1 mg/kg/jour
de l'Azathioprine à la dose de 2,5 mg/kg/jour

Ce traitement est actuellement bien toléré : pas de trouble digestif, pas de glycosurie, léger faciès cushinghoïde ; pas de diminution importante du taux des granulocytes, pas de toxicité hépatique.

Au cours des quatre premières semaines, les faits suivants ont été observés :

. Disparition quasi-immédiate de la fièvre.

. Régression pratiquement complète des exsudats dysoriques.

. Très nette diminution du syndrome hémolytique : l'hématocrite, amené artificiellement par des transfusions à 35 % lors de la sortie de la malade, s'était maintenu à ce taux une semaine après la sortie, soit deux semaines après le début du traitement ; il est à 41 % deux semaines plus tard, avec un taux d'hémoglobine de 12,5 g/100 ml. Aux mêmes moments, le taux de réticulocytes était de 1,1 millions/mm3, puis 800 000/mm3, enfin 600 000/mm3.

. Le taux de plaquettes, maintenu stable autour de 100 000/mm3 durant les trois premières semaines de traitement s'est par contre abaissé aux alentours de 60 000 à la quatrième semaine. Il s'agit probablement d'une conséquence de l'effet dépresseur de l'Azathioprine sur les fonctions médullaires. Au cours de tels incidents, il est relativement rare d'observer un tel effet dépresseur sur les mégacaryocytes non accompagné de leucopénie ; le caractère apparamment sélectif de cette dépression dans le cas particulier témoigne peut-être de la persistance d'un processus de destruction périphérique.

. Sur le plan néphrologique, aucune tendance à l'amélioration ne s'est manifestée : la protéinurie et le syndrome néphrotique persistent, aussi importants ; une hématurie microscopique massive se poursuit.

Ainsi, on a observé, en coïncidence avec un traitement corticoïde et immunosuppresseur une régression des manifestations qui caractérisaient cette "poussée" : anémie hémolytique intense, manifestations générales et exsudats dysoriques ; la responsabilité du traitement dans cette régression est impossible à définir. Les autres anomalies, qui ne semblent pas s'être accentuées parallèlement, ne se sont pas non plus modifiées dans le sens d'une amélioration. Il est de toute façon impossible, en l'absence de recul suffisant, de caractériser tant l'évolutivité propre que la sensibilité au traitement de chacun des syndromes observés chez cette patiente.

I - RECHERCHE D'UNE SENSIBILISATION CELLULAIRE VIS-A-VIS DE L'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE

Méthodes

Un acide désoxyribonucléique natif, extrait de thymus de veau (Worthington Biochemical Corporation) a été utilisé. Une première solution à 200 γ/ml dans du sérum physiologique stérile a été pratiquée en deux temps : solution à 2,5 mg/ml, conservée une nuit à + 4°, puis ajustée à 200 γ/ml. Cette solution a été répartie en fractions nécessaires pour chaque test, conservées à - 20°. Chaque échantillon a été décongelé au moment de l'emploi. Les dilutions successives ont été faites dans le milieu utilisé pour le test correspondant.

Les préparations de membranes basales glomérulaires et tubulaires :

Les membranes basales ont été isolées de reins humains normaux par le Dr. Ph. Mahieu selon une technique décrite (31).

En résumé, glomérules et tubules rénaux sont séparés par passage sur des tamis calibrés ; les cellules sont détruites par sonication et éliminées par centrifugation différentielle. Les antigènes sont obtenus par solubilisation soit par l'eau chaude à 60° pendant trois heures, soit par digestion enzymatique à la collagénose (tampon Tris acétate 0 I M, pH 7,4 , pendant trois jours à 37°). L'analyse biochimique de ces extraits a montré les faits essentiels suivants :

- teneur en protéine de l'antigène (Kjeladahl et Biuret) : 80 %
- contamination : 10 % de réciproque
- contaminants de la préparation de la membrane basale tubulaire (absents de la préparation de la membrane basale glomérulaire) :
  - . collagène : 10 %
  - . acide désoxyribonucléique : 1 % (diphényl-réaction de Burton)
  - . acide ribonucléique : 1 % (réaction d'Orcinol).

L'antigénicité de telles préparations a été démontrée (25).

La préparation de collagène, isolé à partir de tendons d'Achille de veau dans le laboratoire du Dr. C. Lapierre (Hôpital de Bavière, Liège) a été également fournie par le Dr. Ph. Mahieu.

La préparation de protéine de paroi streptococcique, provenant du Rockfeller Institute a été fournie par le Dr. J.F. Bach.

La fixation des antigènes sur des hématies humaines a été réalisée au moyen de chlorure de chrome (19,38).

0,1 γ d'acide désoxyribonucléique ou 1 mg de préparation de membranes basales dissous dans 0,5 ml de tampon Mayer sont incubés 4 minutes avec 0,3 ml d'une solution de chlorure de chrome à 0,5 % ; 0,5 ml de culot d'hématies (autologues ou homologues ORH⁻) préalablement lavées trois fois dans du tampon Mayer sont ajoutées au mélange précédent ; l'ensemble est incubé 15 minutes ; les hématies sont ensuites lavées trois fois et resuspendues à la concentration voulue, dans du tampon Mayer pour les hémagglutinations, dans du milieu de Hanks pour la recherche des rosettes. Toutes les manipulations sont faites à 4° et stérilement.

La réalité de la fixation est vérifiée pour chaque préparation par une réaction d'hémagglutination passive, soit avec le sérum d'un malade ayant des anticorps anti ADN, soit avec un sérum de lapin immunisé contre les membranes basales ; les différentes catégories de témoins ne donnent pas de réaction d'hémagglutination.

Dans le cas des préparations de membrane basale, la spécificité du couplage sur les hématies a été affirmée par inhibition de l'hémagglutination passive au moyen de l'antigène.

Les suspensions d'hématies sont utilisées le jour même.

L'isolement des lymphocytes du sang périphérique est réalisé par centrifucation sur gradient de Ficoll, ce qui permet d'obtenir une population comportant environ 90 % de lymphocytes. Les cellules sont ensuite lavées trois fois dans du milieu de Hanks.

La recherche de cellules formant les rosettes a été effectuée de la façon suivante :

mélange d'une suspension de 0,1 ml de lymphocytes à 30 000/mm3 et de 0,1 ml d'hématies à 120 000/mm3 ; les cellules sont suspendues dans du milieu de Hanks ; adjonction de 0,3 ml de milieu de Hanks. On a ainsi une suspension de lymphocytes à la dilution finale de 6 000/mm3 et une proportion de 4 hématies par lymphocyte.

Les cellules sont laissées à sédimenter 2 heures à la température du laboratoire, puis sont remises en suspension par agitation pendant

10 minutes. Les images de rosettes sont comptées dans cette préparation, et exprimées par rapport au nombre de lymphocytes observés (35).

Le test d'adhérence lympho-plaquettaire a été réalisé selon la technique décrite par J. Hamburger (21) à ceci près que les lymphocytes ont été isolés par centrifugation sur gradient de Ficoll. Le nombre de lymphocytes formant des images d'adhérence avec au moins trois plaquettes a été compté sur 1 000 lymphocytes, et ramené à un pourcentage.

Le test de migration des leucocytes du sang périphérique a été réalisé selon une technique voisine de celle décrite par Soborg et Bendixen (41).

Le sang est recueilli sur calciparine, stérilement et dans du matériel en plastique. Les leucocytes sont isolés par simple sédimentation (90 mn à 37 °), puis lavés trois fois, les deux premières en milieu de Hanks, la dernière en milieu 199. La suspension cellulaire est suspendue à 12 000/mm3 dans du milieu 199 contenant 10 % de sérum de cheval. Elle est mise dans des tubes capillaires, qui sont centrifugés 10 mn à 1 500 g. Les tubes sont sectionnés à la limite du culot cellulaire et disposés dans des cupules. Celles-ci sont emplies de milieu contenant éventuellement l'antigène à la dilution voulue, et recouvertes d'une lamelle. Les cupules, placées dans des boites de Pétri sont incubées 18 heures à 37°. L'ensemble des manipulations est fait stérilement, et en utilisant des récipients de plastique ou de verre siliconé.

L'aire de migration est mesurée, pour chaque cupule, par décalquage, en se référant à un système de projection, et quantifiée par pesée du calque. La moyenne des aires de migrations est calculée pour chaque dilution d'antigène ; pour chaque dilution, l'index de migration est exprimé par le rapport de cette moyenne à la moyenne des aires de migration témoins observées en l'absence d'antigène.

Pour chaque expérience, le nombre des cupules témoins est habituellement de 6 ; au cours de cette étude, il a parfois été supérieur, jamais inférieur ; le nombre de cupules a été habituellement de 6 pour chaque dilution d'antigène, parfois de 3 . Le seuil d'inhibition peut être fixé à 0,70 dans ces conditions techniques. En effet, sur chacun des 67 premiers tests d'une autre étude réalisée dans les mêmes conditions expérimentales dans le laboratoire, les déviations standards des moyennes des aires de

migrations témoins sans antigène ont été calculées ; elles ont été exprimées en proportion de la moyenne correspondante ; la moyenne de toutes ces déviations standards est de 0,15. Ainsi, la limite inférieure de l'intervalle de confiance à 5 % d'un index de migration, mesuré en l'absence de tout facteur inhibant, peut-elle être fixée à 0,70 ; le risque consenti de fausse positivité dans l'affirmation d'une inhibition de migration est de 2,5 %.

Résultats de ces études

La recherche de cellules formant les rosettes :

Les lymphocytes de Mme Der. se sont révélés capables de former des images de rosettes avec ses propres hématies, lavées trois fois, alors qu'aucune image de rosette n'a été observée dans les autres combinaisons.

lymphocytes / hématies	Mme Der.	Témoin
Mme Der.	2 7 (0)	0 0
Témoin (sujet normal, isogroupe ABO Rh)	0 0	0 0

Nombre de rosettes observées pour 12 000 lymphocytes observés, au cours de deux expériences faites à des dates différentes

Il convient de signaler que, à l'occasion de très nombreuses observations réalisées dans le laboratoire de la Clinique Néphrologique, il n'a pas été reconnu d'image de rosettes entre des lymphocytes humains et des hématies humaines, homologues ou autologues, dans des circonstances normales.

Un nombre plus important de rosettes a été observé lorsque les hématies de Mme Der., préincubées en présence d'ADN et de chlorure de chrome, ont été mises en présence de ses propres lymphocytes. Au cours de

deux expériences faites à des dates différentes, les nombres de rosettes suivants ont été observés, pour 12 000 lymphocytes :

lymphocytes / Hématies Der.	Mme Der.		Témoin	
non traitées	2	0	0	0
pré-incubées	13	24	0	0

Au cours des mêmes expériences, il a été observé un nombre voisin de rosettes entre les lymphocytes de Mme Der. et des hématies d'un sujet ORh⁻ pré-incubées en présence d'ADN et de chlorure de chrome ; les témoins utilisant des hématies non traitées ne comportaient pas de rosette. Il n'a pas pu être pratiqué de témoins avec les mêmes hématies pré-incubées en présence de chlorure de chrome, sans ADN, en raison d'une tendance à l'agglutination spontanée des globules rouges ainsi traités. Des globules rouges sur lesquels avait été fixé un antigène différent (membrane basale glomérulaire, nous allons le voir) n'ont pas réalisé d'images de rosettes.

En effet, aucune image de rosette n'a été observée entre les lymphocytes de Mme Der. et des hématies homologues recouvertes de préparation de membrane basale glomérulaire. De même, on a observé des nombres très faibles de rosettes entre les hématies de Mme Der. recouvertes de préparation de membrane basale glomérulaire et ses propres lymphocytes : ces nombres étaient tout-à-fait comparables à ceux observés avec les mêmes hématies non traitées.

Par contre, lorsque la préparation de membrane basale tubulaire a été utilisée pour recouvrir les hématies, dans les mêmes conditions, on a observé l'apparition de rosettes, ou l'augmentation de leur nombre, selon qu'il s'agissait d'hématies homologues ou autologues.

Rosettes observées pour 12 000 lymphocytes :

lymphocytes / Hématies Der.	Mme Der.	Témoin
non traitées	2 0	0 0
recouvertes de membrane basale tubulaire	20 34	0 0

Ainsi, on peut penser que la fixation sur les hématies de ces deux antigènes entraine l'apparition d'images de rosettes lorsqu'elles sont incubées en présence des lymphocytes de Mme Der. Ce phénomène n'a pas été observé avec les lymphocytes de 5 sujets normaux étudiés parallèlement ; ces résultats négatifs ont été par la suite confirmés chez plusieurs autres sujets normaux.

Test d'adhérence lympho-plaquettaire :

Le test pratiqué selon la technique habituelle, en présence de complément, a donné les résultats suivants :

lymphocytes / plaquettes	Mme Der.	Témoin
Mme Der.	2,1 %	1,9 %
Témoin 1	0,6 %	0,3 %

Le nombre d'images d'adhérence observées entre les lymphocytes de Mme Der. et ses propres plaquettes est supérieur à ce qu'on observe habituellement dans un système autologue (21). La moyenne des nombres d'images d'adhérence observées chez 278 sujets normaux a été en effet de $0,35 \pm 0,24$. Le chiffre observé ici peut donc être considéré comme anormal

dans la mesure où il se situe largement en dehors de l'intervalle de confiance à 5 % de cette moyenne. Lorsque les lymphocytes de Mme Der. sont mis en présence de plaquettes allogéniques, le nombre d'images d'adhérence observées se situe dans les limites de la normale : dans la même série d'expérience portant sur des sujets normaux, le nombre moyen d'images d'adhérence en système allogénique était de 1,05 $\pm$ 0,79.Chez la malade, le nombre d'images d'adhérence paradoxalement plus faible dans la combinaison allogénique que dans la combinaison autologue suggère que dans cet accroissement les plaquettes de Mme Der. sont peut-être plus en cause que ses lymphocytes. La comparaison des nombres absolus d'images d'adhérence observées dans différentes combinaisons et dans les mêmes conditions expérimentales, lorsqu'on utilise soit les plaquettes de la malade, soit les plaquettes d'un sujet normal montre qu'il existe une différence significative avec un $p < 0,01$.

On a recherché si la présence de complément, ajouté à la préparation dans le test standard, jouait un rôle dans cette probable augmentation. Un nouveau test, réalisé uniquement avec les propres plaquettes de la malade n'a pas permis de mettre en évidence de rôle du complément.

lymphocytes	Mme Der.	Témoin
avec C	1,35 %	2,1 %
sans C	1,8 %	1,5 %

Etude de la migration des leucocytes du sang périphérique :

. En présence d'acide désoxyribonucléique :

Cinq séries de tests ont été effectués à des dates différentes sur les lymphocytes de Mme Der. Douze séries de tests ont été effectués chez douze témoins : 9 sujets normaux âgés de 25 à 40 ans et 3 sujets atteints de néphropathies glomérulaires avec syndrome néphrotique (chez un homme jeune atteint d'amylose secondaire à une tuberculose pulmonaire guérie, un autre homme atteint de glomérulonéphrite membrano-proliférative en apparence primitive, et une jeune femme atteinte de glomérulonéphrite extra-membraneuse, chez laquelle aucun élément en faveur

d'une maladie générale n'a pu être mis en évidence).

Les tests ont été faits aux dilutions d'ADN de raison 10, de 10 γ /ml à 0,01 γ /ml. Tous les sujets n'ont pas été testés pour toutes les dilutions d'ADN.

Les index de migrations observés chez ces différents sujets sont consignés dans le diagramme de la p. 25 . L'examen de ces résultats montre :

- que (cf p. 25) si l'on adopte comme seuil d'inhibition la valeur 0,70 (justifiée par l'analyse quantitative de la variabilité de la technique) on n'observe aucune inhibition chez les sujets témoins dans la gamme des concentrations utilisées. Par contre chez Mme Der. :

  2 tests sur 3 montrent une inhibition à la concentration d'ADN de 0,1 γ /ml

  2 sur 4 à la concentration de 1 γ /ml

  2 sur 2 à la concentration de 10 γ /ml

  La moyenne des index de migration pour une même dilution d'ADN chez Mme Der. est inférieure à 0,70 aux dilutions de 1 γ /ml et de 10 γ /ml.

- que (cf tableau ci-dessous) si l'on compare la moyenne de l'ensemble des tests effectués chez Mme Der. à la moyenne de l'ensemble des tests effectués chez les témoins, il existe une différence statistiquement significative entre ces moyennes jusqu'à la dilution de 0,1 γ /ml.

	0,01 γ /ml	0,1 γ /ml	1 γ /ml	10 γ /ml
Mme Der.	0,97 ± 0,01	0,72 ± 0,09	0,61 ± 0,19	0,45 ± 0,06
Témoins	0,92 ± 0,01	1,01 ± 0,16	0,99 ± 0,22	1,07 ± 0,23
t		3,02	2,43	3,61
p	N.S.	< 0,02	< 0,05	< 0,01

- que (cf p. 26) l'inhibition de migration observée chez Mme Der. est d'autant plus marquée que la concentration d'ADN introduite dans le milieu est plus forte. La corrélation négative observée entre les index de migration et la quantité d'ADN est hautement significative : $r = -0,826$, ce qui correspond à un $p < 0,01$.

  A l'inverse, une telle corrélation n'est pas observée pour les tests effectués chez les sujets témoins, tant chez un même individu que pour l'ensemble des sujets traités.

Ainsi, la migration des leucocytes de Mme Der. est inhibée en présence de la préparation d'ADN utilisée ; une telle inhibition n'a pas été observée chez divers témoins, et les résultats obtenus chez Mme Der. sont significativement différents de ceux de ces témoins. Enfin, il existe une relation dose-effet très nette dans le degré d'inhibition observée.

. En présence de préparations de membranes basales :

Les résultats suivants ont été observés, lors de la première hospitalisation de la malade dans le Service du Professeur Hamburger, et indépendamment des études ultérieures faites avec l'ADN :

- un index de migration normal en présence de membrane basale glomérulaire, jusqu'à une concentration de 1 mg/ml
- une inhibition de la migration en présence de membrane basale tubulaire :
  0,55 à la concentration de 0,5 mg/ml
  0,70 à la concentration de 0,25 mg/ml

Ces faits ont été confirmés à deux reprises lors de la deuxième hospitalisation de la malade.

Au cours d'une étude réalisée dans le même laboratoire (30), il n'a été observé aucune inhibition de migration chez des sujets normaux, avec les mêmes préparations pour des concentrations inférieures à 2 mg/ml (15 tests réalisés). Des inhibitions de migrations ont été constatées chez 9 sujets atteints de néphropathies glomérulaires parmi plus de 70 étudiés ; chez ces sujets ayant un test positif, il n'a jamais été observé une telle discordance entre les résultats obtenus en présence de membranes basales glomérulaire et tubulaire. Cette discordance est à rapprocher de celle observée dans l'étude des cellules formatrices de rosettes avec les hématies recouvertes de ces deux antigènes. Une

explication peut en être recherchée dans la différence de composition biochimique de ces deux types de préparations : la préparation de membrane basale tubulaire contient 1 % d'ADN (contaminant cellulaire) ; la comparaison des seuils d'inhibition avec l'ADN (500 γ /ml) et avec la préparation de membrane basale tubulaire (1 γ /ml) suggère que l'inhibition observée en présence de celle-ci pourrait être liée au contaminant ADN qu'elle contient. Comme le contaminant quantitativement le plus important de la préparation de membrane basale tubulaire est le collagène

les index de migration en présence de diverses concentrations de collagène ont été mesurés :

0,80 avec 0,5 mg/ml
0,80 avec 0,25 mg/ml
0,79 avec 0,125 mg/ml

ce qui exclut un rôle éventuel du collagène.

enfin, l'index de migration a été mesuré en présence de concentrations de protéine de paroi streptococcique qui inhibent la migration des leucocytes de la plupart des sujets normaux dans la mesure où ils sont sensibilisés au streptocoque (12) : une inhibition a été observée à la concentration de 250 γ /ml (il n'a pas été utilisé de concentration inférieure). Celà constitue un argument tout-à-fait indirect et non formel, pour penser qu'il n'existe pas chez notre malade de diminution notable de l'hypersensibilité retardée, tout au moins pour les immunisations vis-à-vis d'antigènes rencontrés auparavant.

Evolution des tests après la mise en route du traitement corticoïde et immunosuppresseur :

- Il n'a pas été retrouvé de cellules formant les rosettes après 10 jours de traitement, tant avec des hématies préincubées en présence d'ADN, de préparation de membrane basale tubulaire et de chlorure de chrome, qu'en présence d'hématies autologues non traitées.
- La migration des leucocytes en présence d'ADN, après 10 jours de traitement a donné des résultats identiques à ceux observés avant traitement (inhibition à 10 γ /ml et 1 γ /ml). Trois semaines après le début du traitement, cette inhibition n'a plus été retrouvée :

1,42 à la concentration de 10 γ /ml
1,10 à la concentration de 1 γ /ml
1,14 à la concentration de 0,1 γ /ml

L'index de migration mesuré pour la concentration de 10 γ /ml d'ADN est supérieur à la valeur théorique fixée par la variabilité de la méthode : il s'agit peut-être là d'une stimulation ; on a montré que ce phénomène pouvait avoir la même signification immunologique qu'une inhibition, témoignant d'un degré de sensibilisation plus faible (--). En fait, il semble plus prudent de ne pas conclure dans ce sens, car le dépassement constaté est faible, et il n'a pas pu être fait de test de contrôle.

Au cours de la même expérience, l'index de migration en présence d'ADN dénaturé (par chauffage à 100° pendant 10 mn, puis refroidissement immédiat) a été déterminé ; il était normal :

0,85 à la concentration de 10 γ /ml
1,19 à la concentration de 1 γ /ml

Légende de la page 25

Index de migration observés dans l'ensemble des expériences réalisées, répartis selon la concentration d'ADN introduite dans le milieu de culture.

▲ sujets normaux

△ sujets atteints de néphropathie glomérulaire non lupique

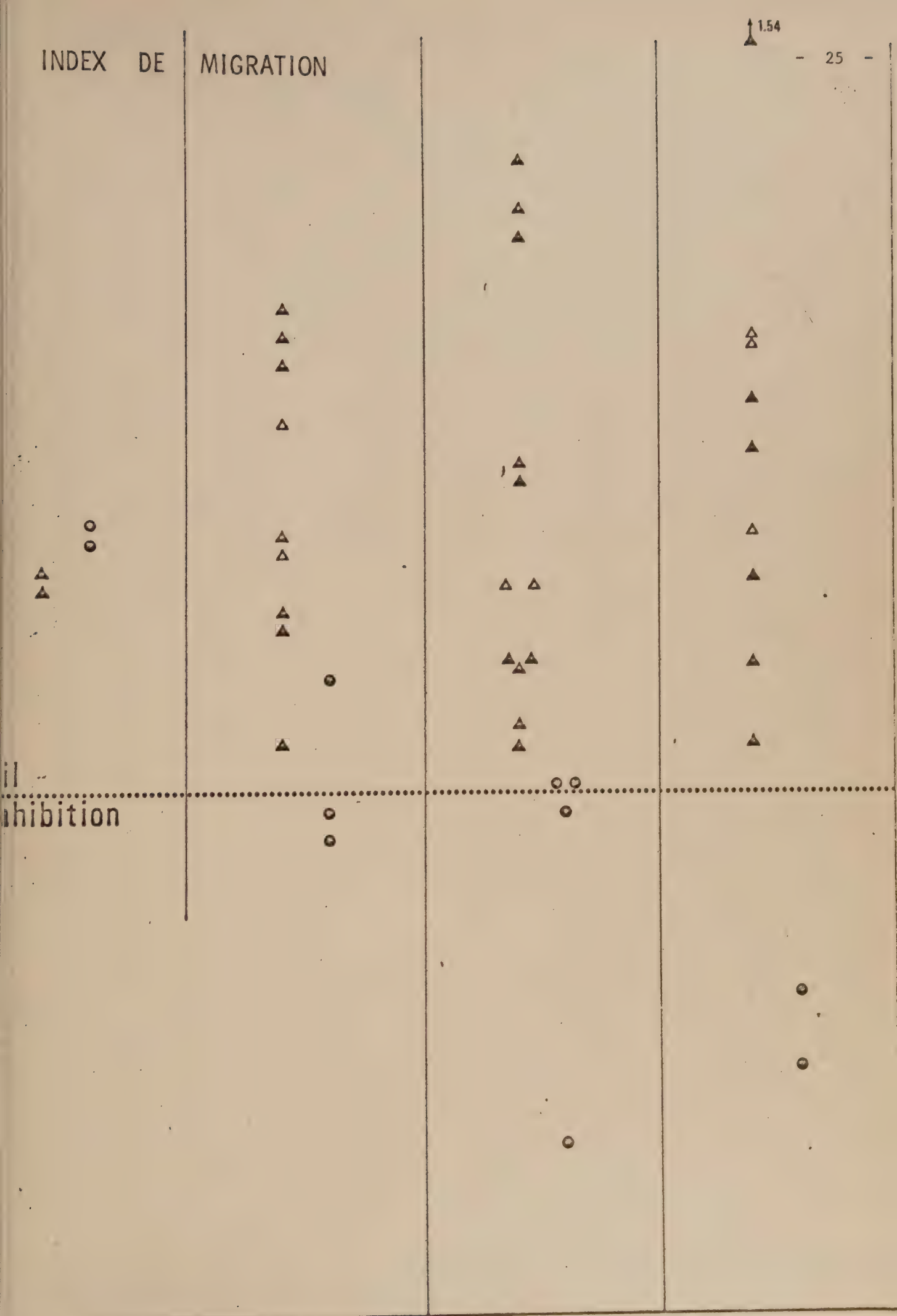
● Der.

Légence de la page 26

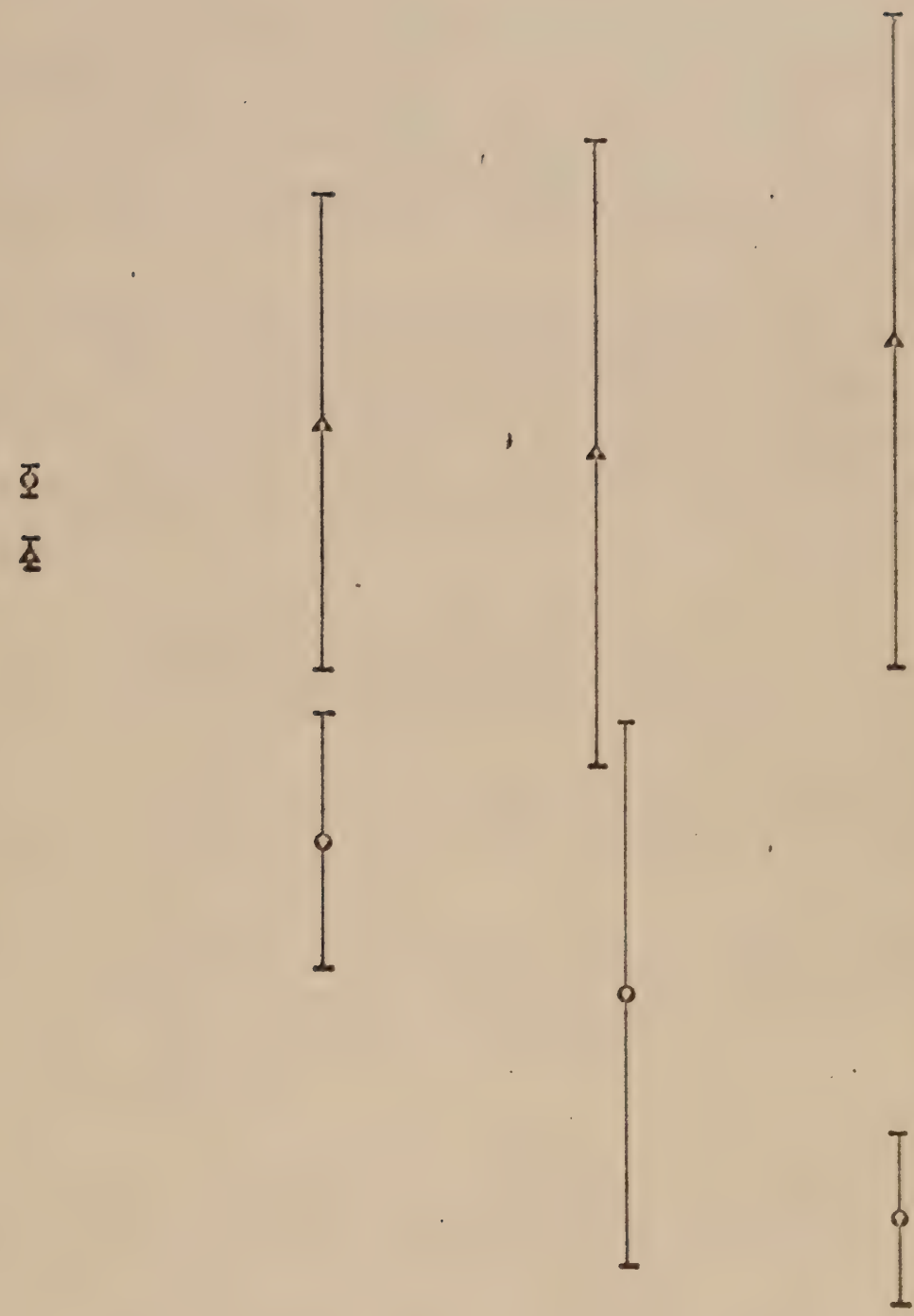
Moyenne des index de migration observés en fonction de la concentration d'ADN introduite dans le milieu de culture.

▲ témoins

● Der.


INDEX DE MIGRATION
1.54
il
hibition
0,01 ɣ/ml
0,1 ɣ/ml
1 ɣ/ml
10 ɣ/ml

MOYENNES ± DEVIATION STANDARD
DES INDEX DE MIGRATION



CONCENTRATION D'A.D.N. (log 10)

0,01δ/ml 0,1δ/ml 1δ/ml 10δ/ml

III - DISCUSSION

Avant tout autre essai d'interprétation, deux points méritent d'être discutés :

- dans quel cadre clinique peut-on inclure ce cas ?
- quelle signification peut-on accorder aux tests immunologiques réalisés ?

Dans quel cadre clinique peut-on inclure le cas de Mme Der. ?

L'ensemble des manifestations présentées par Mme Der. peut avoir été le fruit d'une coïncidence de plusieurs affections. Cependant l'hypothèse d'une maladie générale expliquant cette association de syndromes relativement peu fréquents est plus satisfaisante. Il faut en effet tenter d'expliquer la coexistence :

- d'une thrombopénie périphérique
- d'une anémie hémolytique avec auto-anticorps
- d'une néphropathie glomérulaire très particulière

L'ensemble paraît évoluer par poussées. Au cours d'une poussée d'hémolyse apparamment spontanée, se sont associés à ces éléments :

- des exsudats dysoriques
- une pneumopathie sans germe décelable et insensible aux antibiotiques, pouvant être d'origine virale, mais pouvant également représenter la localisation d'une maladie générale.
- une aménorrhée.

La mise en oeuvre d'un traitement corticoïde et immunosuppresseur a coïncidé avec la disparition quasi-immédiate de la fièvre, la disparition des exsudats dysoriques, une nette amélioration du syndrome hémolytique.

Chez cette femme jeune, un tel tableau évoque très fortement une maladie lupique. Cependant il n'a pas été possible d'en faire la preuve. Toutes les recherches de cellules L.E. ont été négatives, il n'a pas été trouvé d'anticorps anti-nucléaires à un titre significatif, ni d'anticorps anti-ADN. Ces résultats négatifs ont d'autant plus de valeur qu'ils sont, au moins à une occasion, contemporains d'une période d'activité de la

maladie éventuelle. Cette négativité amène pour de nombreux auteurs à une exclusion du diagnostic de maladie lupique (11). Pourtant, on peut, dans de tels cas, selon Dubois (14) donner une probabilité de diagnostic en fonction de critères cliniques et biologiques non spécifiques. La discussion du cas de Mme Der. à la lumière de cette classification demeure délicate et ne nous semble pas permettre d'aboutir au diagnostic suspecté : certes, on a constaté chez cette malade l'association de quatre syndromes considérés comme "critères majeurs" par Dubois, ce qui pourrait autoriser le diagnostic de "lupus défini" ; cependant, une telle assimilation n'est possible que dans la mesure où l'analyse de ces manifestations les montre compatibles avec des déterminations de la maladie.

Examinons ce point :

La nature de la pneumopathie est, nous l'avons vu, impossible à déterminer.

Le purpura thrombopénique a été la première manifestation pathologique, et est resté isolé pendant plusieurs années. Il est rare qu'une thrombopénie représente la manifestation initiale d'un lupus (14, 15). Cependant, de nombreuses observations en ont été rapportées, et l'intervalle qui sépare l'apparition de la thrombopénie de celle des autres manifestations de la maladie peut être relativement long : 10 ans dans un cas cité par Dubois (14) ; Levine et Shearn (28) ont signalé l'existence de cas où un purpura thrombopénique a été la seule manifestation d'un lupus, durant toute son évolution. Certes, les anomalies biologiques du lupus existaient dans la plupart de ces cas, mais les observations où elles ont tardé à apparaître ne sont pas rares, et Dubois (14) souligne l'absence habituelle de facteur L.E. à la période initiale, lorsque la thrombopénie est réellement isolée.

Les classes d'immunoglobulines impliquées dans l'anémie hémolytique observée chez notre malade (IgG et IgM fixant le complément) réalisent une association qui est rencontrée dans la plupart des cas de lupus érythémateux disséminé (18). L'association d'un purpura thrombopénique à une anémie hémolytique de ce type n'est pas impossible en dehors de toute maladie lupique (24) ; de tels cas peuvent comporter une hypergammaglobulinémie. La dissociation entre l'intensité de ces deux syndromes observée chez notre malade est peut-être à rapprocher du fait observé par Dubois (14) que dans son expérience la splénectomie a entrainé une remarquable fréquence d'amélioration des thrombopénies, alors qu'elle n'a eu qu'un effet très

inconstant sur les anémies hémolytiques.

Le type de glomérulopathie présenté par Mme Der. peut-il être assimilé à l'une des formes que peut prendre la néphropathie lupique ?

- Les lésions glomérulaires observées chez cette malade sont complexes. Le fait marquant est l'existence de dépôts extra-membraneux fibrinoïdes. La taille, la diffusion et la disposition irrégulière de ces dépôts ne permettent pas de les assimiler aux "humps" classiques rencontrés au cours de la glomérulonéphrite aiguë. Ils s'apparentent aux dépôts rencontrés dans la glomérulonéphrite extra-membraneuse. Cependant, un certain nombre d'éléments séparent ce cas du cadre des glomérulonéphrites extra-membraneuses :

. Le caractère segmentaire des dépôts argentaffines et des massues.

surtout, l'association à des lésions qui ne s'observent pas au cours de la glomérulonéphrite extra-membraneuse primitive :

. une prolifération endocapillaire modérée, mais indiscutable, plus importante en certains foyers
. des dépôts sous-endothéliaux et intercapillaires.

L'ensemble de cet aspect est compatible avec celui de glomérulonéphrite membrano-proliférative. Mais l'importance et la diffusion des dépôts extra-membraneux rendent ce cas inhabituel.

Il est actuellement bien acquis que l'aspect anatomopathologique des glomérulopathies observées au cours du lupus érythémateux n'est pas univoque (5, 22, 37). A côté des formes prolifératives, diffuses ou focales, il existe des glomérulonéphrites extra-membraneuses. Si l'aspect histologique de ces formes extra-membraneuses de la glomérulopathie lupique est habituellement semblable à celui des formes primitives, c'est parmi elles que l'on constate le plus volontiers l'association d'une prolifération mésangiale modérée (5).

L'étude analytique des fixations observées en immunofluorescence montre une bonne corrélation avec les lésions élémentaires constatées en microscopie optique : on retrouve, d'une part des dépôts pariétaux granuleux, d'autre part des dépôts mésangiaux. L'aspect réalisé est très différent de ce qu'on observe au cours des glomérulonéphrites membrano-prolifératives ; il est avant tout celui d'une glomérulonéphrite extra-membraneuse (8). L'aspect en immunofluorescence des formes extra-membraneuses des glomérulo-

néphrites lupiques est considéré en général comme strictement superposable à celui des formes primitives de cette glomérulopathie (33). L'absence de fixation du sérum anti C_3 sur les dépôts pariétaux est considéré par Berger comme pouvant être lié aux propriétés du réactif utilisé (8) ; la présence de C_4 sur de telles lésions cadre avec les observations - encore trop peu nombreuses pour permettre une généralisation - que cet auteur a pu faire au cours de plusieurs cas de glomérulonéphrites extra-membraneuses primitives. Quoi qu'il en soit, la fixation du sérum anti C_3 sur les dépôts extra-membraneux n'est pas constante au cours de ces formes de néphropathie lupique (33).

Ainsi, l'ensemble des données ne permet pas un classement histologique satisfaisant, mais oriente fortement vers une glomérulonéphrite extra-membraneuse, dont les atypies même plaident en faveur du caractère secondaire.

Au cours d'une telle néphropathie, la mise en évidence d'un taux sérique normal de $_{1C}$, lors d'une période d'activité que l'on pourrait qualifier de "subaiguë", mérite d'être discutée. S'il existe une bonne corrélation entre l'existence d'une néphropathie lupique et l'abaissement du taux de ce composant sérique, cette règle souffre des exceptions : l'abaissement du taux de β_{1C} sérique n'est pas retrouvé chez tous les patients présentant un syndrome néphrotique (20) ; de même, un taux normal a pu être observé au cours de périodes d'"activité définie" de la maladie, chez des sujets ayant une néphropathie (26) ; dans ces derniers cas, le taux de C_4 sérique était abaissé, ce qui est peut-être à rapprocher de l'aspect réalisé en immunofluorescence sur la biopsie rénale de notre patiente. Enfin les données citées concernant le taux du complément sérique au cours des néphropathies lupiques ne tiennent pas compte de l'aspect des lésions rénales en cause. En effet, on sait qu'au cours des formes primitives de glomérulonéphrites extra-membraneuses, le taux du complément sérique est habituellement normal ; nous n'avons pas retrouvé d'étude systématique comparant les formes primitives et secondaires à un lupus de cette néphropathie pour ce critère. Il est remarquable que, dans une étude de Drinkard et coll. (13) le taux du C_3 sérique, dosé avant tout traitement, était trois fois normal, et une fois à peine abaissé au cours des quatre formes extra-membraneuses de néphropathies lupiques qu'il analyse ; or il s'agissait de formes "actives" puisque malgré un traitement intensif, aucune amélioration clinique n'a été obtenue, et que les biopsies de contrôle ont montré une progression des lésions.

Au terme de cette discussion, l'existence d'une maladie générale, évoquant par bien des points le lupus érythémateux disséminé, apparaît tout-à-fait probable chez cette jeune femme. Il semble cependant impossible avec les données que nous possédons d'inclure de façon formelle ce cas dans le cadre du lupus.

Quelle interprétation peut-on proposer pour les résultats des tests immunologiques effectués ?

La signification de certains résultats n'apparaît pas clairement :

- Il est très probable que les plaquettes de Mme Der. aient la propriété d'adhérer aux lymphocytes, aussi bien autologues qu'homologues, davantage que les plaquettes normales. Il est impossible de dire si ce phénomène relève d'un mécanisme immunologique, et s'il a une signification physiopathologique. Cependant, celà suggère que l'étude du phénomène d'adhérence lympho-plaquettaire pourrait apporter des éléments d'analyse dans l'étude de certains purpuras thrombopéniques où la démonstration directe d'un phénomène auto-immun est rarement obtenue.

- L'interprétation des résultats obtenus dans la recherche des rosettes entre les lymphocytes de Mme Der. et des hématies humaines est également délicate. En effet, les seules images de rosettes observées l'ont été entre les propres hématies et les propres lymphocytes de la malade. Celà ne cadre avec aucune des hypothèses que l'on peut faire sur la signification de telles rosettes :

propriété particulière des cellules nucléées de la malade :

. soit qu'existent dans le sang circulant des cellules porteuses de déterminants anticorps dirigés contre les hématies humaines ; de telles images de rosettes ont été observées au cours d'isoimmunisation dans le système ABO ou anti-D (3).

. présence d'anticorps cytophiles sur des cellules de type macrophagique non éliminées par la technique de séparation cellulaire.

Dans ces deux cas, la spécificité du phénomène devrait correspondre à celle des anticorps circulants.

phénomène secondaire à la fixation d'anticorps et de complément sur les hématies de Mme Der., et visualisant les récepteurs fixés sur les

leucocytes normaux :

. soit pour les IgG (29) ; dans ce cas, le pourcentage de cellules formant les rosettes est voisin de celui que nous avons observé mais ce phénomène est inhibé par pré-incubation des lymphocytes dans du sérum humain normal, ce que nous n'avons pas observé.

. soit pour le complément (32).

Dans ce cas, le phénomène devait s'observer en mettant en présence les hématies de la malade avec les lymphocytes d'un sujet différent.

La réalité de la formation de rosettes entre les lymphocytes de Mme Der. et des hématies humaines recouvertes d'ADN apparaît vraisemblable, et semble tout-à-fait spécifique, pour la malade, et pour les hématies traitées par l'agent fixant et l'ADN. L'existence d'anticorps cytophiles étant exclue dans ce cas, elle peut être interprétée comme la visualisation de cellules lymphoïdes porteuses de déterminants dirigés contre l'ADN. Cependant, celà ne pourra être affirmé qu'à la condition de compléter cette étude dans deux directions :

- la vérification, par un plus grand nombre de témoins, de l'absence d'artéfact et de la singularité du phénomène ; sa disparition sous traitement, alors que l'état de la malade s'était nettement amélioré, apporte un premier élément de réponse à cette question.

- l'affirmation qu'il est spécifique de l'ADN ; la réalité de la fixation de l'ADN sur les hématies bien que très probable n'a pas été formellement démontrée ; la réaction en cause peut être le fait d'un contaminant de la préparation utilisée - encore que les concentrations d'ADN utilisées pour la fixation sur les hématies (0,1 γ /ml) rendent cette possibilité peut vraisemblable (les concentrations nécessaires pour une fixation d'antigène protéique sont, dans les mêmes conditions, de l'ordre du mg/ml). La réponse ne peut être apportée que par des expériences d'inhibition, impossibles chez Mme Der mais que l'on peut envisager à l'occasion d'études de ce type chez d'autres malades.* De telles expériences d'inhibition, si elles se révèlent positives, permettraient en outre d'avoir une idée de l'affinité de la réaction en cause.

---

* Des rosettes avec des hématies pré-incubées en présence d'ADN ont récemment pu être observées chez deux malades atteintes de lupus, avant tout traitement.

L'interprétation des résultats des tests de migration des leucocyte périphériques apparaît plus clairement :

L'existence d'une corrélation entre la positivité de ce test et l'existence d'une hypersensibilité retardée est actuellement bien établie, tant pour les antigènes solubles (39) que pour les antigènes particulaires (41). Cette inhibition de la migration des leucocytes du sang périphérique est secondaire à la libération d'un facteur non dialysable, par les lymphocytes spécifiquement sensibilisés incubés en présence de l'antigène (7). Dans le même système, il est possible d'obtenir une inhibition par complexes antigène-anticorps (42), mécanisme qui ne peut être en cause dans ce cas particulier. Si l'on admet la réalité de l'inhibition observée et sa spécificité pour l'antigène utilisé dans les tests - et ces deux données apparaissent statistiquement indiscutables - ces résultats traduisent l'existence d'une sensibilisation cellulaire chez Mme Der. Il n'a pas été réalisé de test en deux temps, permettant d'affirmer la secrétion de facteur inhibant la migration des leucocytes, en testant l'action d'un surnageant de culture de lymphocytes en présence d'ADN sur des lymphocytes d'un sujet témoin. Mais nous avons pu montrer, au cours de deux expériences différentes que l'utilisation, dans un test où le milieu contenait 1 γ/ml d'ADN, de lymphocytes de la malade préincubés 2 heures à 37° en présence de 10 γ/ml d'ADN, permettait d'accentuer de façon très nette l'inhibition observée, par rapport aux résultats obtenus avec 1 γ/ml d'ADN. Ces résultats apportent un argument important en faveur d'un rôle actif des lymphocytes mis en présence d'ADN. La disparition de l'inhibition observée après un certain temps de traitement corticoïde et immunosuppresseur est un autre argument en faveur de ce mécanisme dans la mesure où des tests effectués chez des transplantés ont montré que de fortes doses de corticoïdes pouvaient négativer un test positif (17).

La responsabilité de l'ADN natif utilisé dans ce test est-elle indiscutable ? Deux autres antigènes ont pu jouer un rôle dans ces tests : une fraction d'ADN dénaturé, et des nucléoprotéines contaminantes présentes en faible proportion dans le type de préparation utilisée. Les très faibles concentrations de la préparation nécessaires pour obtenir une inhibition significative rendent cette hypothèse peu probable.

Ainsi l'existence d'une sensibilisation cellulaire vis-à-vis de l'ADN apparaît extrêmement probable chez Mme Der.

Ces résultats permettent-ils d'éclairer la situation pathologique observée chez cette malade ?

A notre connaissance, les tests recherchant une sensibilisation cellulaire vis-à-vis de l'ADN ont été peu utilisés au cours du lupus érythémateux disséminé.

- La recherche de cellules formant des rosettes n'a pas été rapportée. Leur existence serait un corollaire logique de la présence d'anticorps circulants ; leur présence en l'absence de tels anticorps représenterait, si elle était démontrée, l'homologue de ce qui a pu être observé au cours de la polyarthrite rhumatoïde (4).

- L'existence d'une cytotoxicité des lymphocytes de patients atteints de lupus a été décrite, vis-à-vis de cellules humaines - encore que la nature de l'antigène impliqué dans cette réaction soit mal précisée (43).

- La stimulation des lymphocytes de tels patients mis en culture en présence d'ADN a été étudiée (9, 36). Il a été constaté, sur un ensemble de malades, une stimulation plus importante que celle observée sur un ensemble de sujets témoins. La positivité de ces résultats contraste avec l'absence, dans les mêmes conditions, de toute stimulation significative de lymphocytes de souris NZB/W sélectionnées pour leur taux élevé d'anticorps anti-ADN circulants (27).

- La migration de leucocytes du sang périphérique de sujets atteints de lupus, en présence d'ADN, a été étudiée par Moulias et coll. (23, 34). Cette étude portant sur 21 sujets atteints de lupus érythémateux disséminé spontané, au moyen d'un antigène de même provenance que celui que nous avons utilisé, a montré l'existence d'une nette inhibition de migration chez un certain nombre de sujets atteints de lupus non traité, et ce à des degrés non observés chez divers sujets témoins. Deux points nous paraissent devoir être soulignés : la concentration relativement élevée d'ADN utilisée dans ces tests (125 γ/ml, soit 10 à 100 fois plus que les concentrations efficaces chez notre malade) et la possibilité d'inhibition de migration au cours d'autres affections dites du collagène (3 cas sur 5 rapportés). Ces résultats apportent donc des éléments en faveur de l'existence d'une hypersensibilité retardée vis-à-vis de l'ADN au cours du lupus, comme cela a été suggéré par les tests cutanés (2). Par contre, ils ne permettent pas encore de situer cette affection par rapport aux autres maladies dites du collagène, en fonction de ce critère. Bien plus, ils semblent orienter vers une relative non spécificité de ce test, ce qui

est assez frappant dans la mesure où la présence d'anticorps circulants dirigés contre l'ADN natif est considérée habituellement comme très spécifique de la maladie lupique (11) et où l'on devrait s'attendre à une spécificité pour l'antigène au moins aussi étroite de la part d'une réaction d'hypersensibilité retardée.

Les données de la littérature sont donc encore trop fragmentaires pour aider à l'interprétation du cas que nous avons observé. Il serait d'autre part logique de compléter des études de ce type par la recherche d'une sensibilisation cellulaire vis-à-vis de l'ADN dénaturé, dans la mesure où l'existence d'anticorps dirigés contre ce composant est plus fréquente au cours du lupus que celle d'anticorps dirigés contre l'ADN natif (1). Si les premiers résultats sont confirmés, une analyse de ce type apporterait des renseignements utiles, tant pour le diagnostic que pour la compréhension de l'affection en cause. L'ensemble de ces faits ne peut que suggérer l'intérêt de telles études, tant chez des malades dont l'affection est bien cataloguée, que chez ceux dont les manifestations pathologiques sont difficilement classables, ou même au cours de certaines formes de néphropathies primitives.

CONCLUSIONS

Chez une jeune femme souffrant depuis 10 ans d'un purpura thrombopénique en apparence idiopathique, un syndrome néphrotique ne s'accompagnant ni d'insuffisance rénale ni d'hypertension artérielle est découvert. Parallèlement, d'autres anomalies apparaissent : une anémie hémolytique avec auto-anticorps, des exsudats dysoriques, une aménorrhée. La biopise rénale permet d'affirmer que le rein est le siège d'anomalies complexes, réalisant une néphropathie difficilement classable, se rapprochant d'une glomérulonéphrite membrano-proliférative, mais avec certains caractères de glomérulonéphrite extra-membraneuse ; en immunofluorescence l'aspect observé se rapproche beaucoup plus de celui d'une glomérulonéphrite extramembraneuse. Un tel aspect anatomo-pathologique est inhabituel au cours des glomérulopathies primitives ; il est compatible avec le diagnostic de néphropathie lupique.

Les examens complémentaires -en l'absence de tout traitement, et à l'occasion de deux poussées évolutives- n'ont pas permis d'affirmer l'existence d'un lupus érythémateux aigu disséminé : présence d'anticorps anti-nucléaires à un titre très faible ; absence de phénomène L.E. et d'anticorps anti ADN. Des tests d'immunologie cellulaire ont été pratiqués. Ils ont montré deux faits essentiels :
- Certains lymphocytes du sang périphérique de cette malade étaient capables de former des images de rosettes lorsqu'ils sont mis en contact avec des hématies recouvertes d'ADN. Le phénomène a disparu après 3 semaines de traitement par les corticoïdes à fortes doses et les immunosuppresseurs.
- La migration des leucocytes du sang périphérique était nettement inhibée en présence d'ADN natif, jusqu'à des concentrations de 0,1 γ/ml. Le degré d'inhibition était très nettement supérieur à ce qu'on peut observer chez les sujets témoins,

et, à l'inverse de ce qui se passe pour les témoins, il existe une corrélation positive ($p < 0.01$) entre la quantité d'ADN utilisée pour le test et le degré d'inhibition.

L'interprétation immunologique de ces faits est discutée. Bien qu'on doive demeurer très prudent dans les conclusions pathogéniques qu'ils suggérent, ils ont l'intérêt d'ouvrir une voie d'exploration jusqu'à présent à peu près complétement négligée dans les maladies dites du collagène.

BIBLIOGRAPHIE

1. ARANA (R.), SELIGMANN (M.). - Antibodies to native and denatured deoxyribonuleic acid in systemic lupus erythematosus.J. clin. Invest. 1967, 46, 1867-1882.

2. AZOURY (F.J.), JONES (H.E.), DERBES (V.J.), GUM (O.B.). - Intradermal tests and antinuclear factors in systemic lupus erythematosus, a comparative study. Ann. intern. Med., 1966, 65, 1221-28.

3. BACH (J.F.). - Résultats non publiés.

4. BACH (J.F.), DELRIEU (F.), DELBARRE (F.L.). - The rheumatoid rosette. Amer. J. Med., 1970, 49, 213-22.

5. BALDWINN (D.S.), LOWENSTEIN (J.), ROTHFIELD (N.F.), GALLO (G.), McCLUSKEY (R.T.). - The clinical course of the proliferative and membranous forms of lupus nephritis. Ann. intern. Med., 1970, 73, 929-42.

6. BARTFELD (H.), ATOYNATAN (T.). - Lymphocyte transformation in multiple sclerosis. Brit. med. J., 1970 (2), 91-2.

7. BENNET (B.), BLOOM (B.R.). - Studies on the migration inhibitory factor associated with delayed type hypersensitivity : cytodynamics and specificity. Transplantation, 1967, 5, 996-1000.

8. BERGER (J.), YANEVA (H.), HINGLAIS (N.). - Immunofluorescence des glomérulo-néphrites. In : Actualités néphrologiques de l'Hôpital Necker. Paris, Flammarion, 1971. p. 17.

9. BRIBET-FORETTE (F.). - Le test de transformation lymphoblastique en présence d' A.D.N. Thèse, Paris, 1969.

10. BROOKMAN (J.A.), STIFFEY (A.V.). - Multiple sclerosis : lymphocyte transformation by basic protein from bovine spinal cord. Experientia, 1970, 26, 413-4.

11. CANNAT (A.), ARANA (R.), SELIGMANN (M.). - Intérêt clinique et modalités pratiques de la recherche d'anticorps anti-acide-désoxyribonucléique (DNA) natif et dénaturé. Rev. franç. Etud. clin. biol., 1967, 12, 1015-20.

12. DARDENNE (M.), BACH (J.F.). - Résultats non publiés.

13. DRINKARD (J.P.), STANLEY (T.M.), DORNFELD (L.), AUSTIN (R.C.), BARNETT (E.V.), PEARSON (C.M.), VERNIER (R.L.), ADAMS (D.A.), LATTA (H.), GONICK (H.C.). - Azathioprine and prednisone in the treatment of adults with lupus nephritis : clinical histological and immunological changes with therapy. Medicine, 1970, 49, 411-32.

14. DUBOIS (E.L.). - Lupus erythematosus. New York, Mac Graw Hill, 1966.

15. ESTES (D.), CHRISTIAN (Ch.L.). - The natural history of systemic lupus erythematosus by prospective analysis. Medicine, 1971, 50, 85-95.

16. FREI (P.C.), SCAZZIGA (B.R.), PERUDET (A.), CRUCHAUD (S.). - Anticorps anti-thyréoglobuline sur les lymphocytes circulants en cas de thyroïdite auto-immune. Helv. med. Acta, 1969, suppl., 48, 111-2.

17. GALANAUD (P.). - Observations personnelles.

18. GERBAL (A.), HOMBERG (J.C.), ROCHANT (H.), PERRON (L.), SALMON (Ch.). - Les auto-anticorps d'anémies hémolytiques acquises. II. Nature, spécificité, intérêt clinique et mécanisme de formation. Nouv. Rev. franç. Hémat., 1968, 8, 351-68.

19. GOLD (E.R.), FUDENBERG (M.M.). - Chronic chloride : a coupling reagent for passive hemagglutination reactions. J. Immunol., 1967, 99, 859-66.

20. GOTOFF (S.P.), ISAACS (E.W.), MUEHRCKE (R.C.), SMITH (R.D.). - Serum béta 1_C globulin in glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. Ann. intern. Med., 1969, 71, 327-33.

21. HAMBURGER (J.). - Sur un phénomène inédit d'adhérence lympho-plaquettaire. C.R. Acad. Sci., 1970, 270, 740-41.

22. HAMBURGER (J.), RICHET (G.), CROSNIER (J.), ANTOINE (B.), DUCROT (H.), FUNCK-BRENTANO (J.-L.), MERY (J.-Ph.), MONTERA (H. de). - Néphrologie. 2 vol. Paris, Flammarion, 1966.

23. HARPEY (J.P.), MOULIAS (R.), GOUST (J.M.), BERTHAUX (P.). - Syndrome lupique induit par la D-pénicillamine au cours d'une maladie de Wilson. Etude immunologique par le test de migration des leucocytes. Ann. Méd. interne, 1971, 122, 261-67.

24. HOMBERG (J.C.), CARTRON (J.), SALMON (Ch.). - Intérêts pratiques de l'étude immunologique des anémies hémolytiques auto-immunes. Rev. Prat., 1971, 21, 1357-75.

25. KEFALIDES (N.A.), WINZLER (R.J.). - Biochemistry, 1966, 5, 702.

26. KOHLER (P.F.), TEN BENSEL (R.). - Serial complement component alterations in acute glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus. Clin. exp. Immunol., 1969, 4, 191-202.

27. LEVENTHAL (B.G.), TALAL (N.). - Response of NZB/NZW spleen cells to mitogenic agents. J. Immunol., 1970, 104, 918-23.

28. LEVINE (S.), SHEARN (M.A.). - Thrombotic thrombocytopenic purpura and systemic lupus erythematosus. Arch. intern. Med., 1964, 113, 826-36.

29. LOBUGLIO (A.), COTRAN (R.S.), JANDL (J.M.). - Red cells coated with Ig G : binding and sphering with mononuclear cells in man. Science, 1967, 158, 1582-85.

30. MAHIEU (Ph.), DARDENNE (M.), BACH (J.F.). - soumis à publication.

31. MAHIEU (Ph.), WINAND (R.J.). - Chemical structure of tubular and glomerular basement membrane of human kidney. Eur. J. Biochem., 1970, 12, 410-18.

32. MICHLMAYR (G.), HUBER (H.). - Receptor sites for complement on certain peripheral blood lymphocytes. J. Immunol., 1970, 105, 670-76.

33. MOREL-MAROGER (L.), MERY (J.-Ph.), DELRIEU (F.), RICHET (G.). - Etude immuno-histo-chimique de 29 biopsies rénales faites au cours du lupus érythémateux disséminé. J. Urol. Néphrol., 1971, 77, 367-379.

34. MOULIAS (R.), GOUST (J.-M.), DEVILLE-CHABROLLE (A.), BUFFET (C.), MULLER-BERAT (C.N.). - Le test de migration des leucocytes du sang périphérique : un nouveau test d'hypersensibilité retardée chez l'homme. Presse méd., 1970, 78, 2315-18.

35. NOTA (N.R.), LIACOPOULOS-BRIOT (M.), STIFFEL (C.), BIOZZI (G.). - L'immunocyto-adhérence : une méthode simple et quantitative pour l'étude des cellules productrices d'anticorps. C.R. Acad. Sci. Paris, 1964, 259, 1277.

36. PATRUCCO (A.), ROTHFIELD (N.F.), HIRSCHKORN (K.). - The response of cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus to D.N.A. Arthr. and Rheum., 1967, 10, 32-37.

37. POLLAK (V.E.), PIRANI (C.). - Renal histologic findings in systemic lupus erythematosus. Proc. Mayo Clin., 1969, 44, 630-44.

38. RENOUX (M.), DUBOIS (M.P.), RENOUX (G.). - Hémagglutination après couplage par le chlorure de chrome. Ann. Inst. Pasteur, 1968, 115, 978.

39. ROSENBERG (S.A.), DAVID (J.R.). - Inhibition of leucocyte migration : an evaluation of this in vitro assay of delayed hypersensitivity in man to soluble antigen. J. Immunol., 1970, 105, 1447-52.

41. SOBORG (M.). - In vitro detection of cellular hypersensitivity in man. Acta med. scand., 1967, 182, 167-74.

42. SPITLER (L.), HUBER (H.), FUDENBERG (H.H.). - Inhibition of capillary migration by antigen-antibody complexes. J. Immunol., 1969, 102, 404-11.

43. TRAYANOVA (F.), SURA (V.), SVIET-MOLDAVSKY (G.). - Destruction of human cells in cultures by lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. Lancet, 1966 (1), 492.